

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17088

研究課題名（和文）AIと神経生理データの癒合による咀嚼障害の治療とALS診断バイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Treatment of masticatory disorders and development of ALS diagnostic biomarkers by fusion of AI and neurophysiological data

研究代表者

関 壮樹（Seki, Soju）

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：60755081

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）において、咀嚼障害がどのように現れるのか、人工知能（AI）を用いた咀嚼行動の検討を行った。さらに、咀嚼を制御する一次感覚ニューロンの異常がどのように推移するのか、電気生理学的な検討を行った。において、ALSモデルマウスの咀嚼行動をビデオカメラで撮影、AIを用いて咀嚼サイクルを自動検出したところ、ALSモデルマスでは野生型マウスと比較し、12週齢頃より咀嚼サイクルが有意に延長することがわかった。においては現在、咀嚼を制御する一次感覚神経の電気生理学的検討を行い、成熟期のALSモデルマウスにおいても異常な発火活動と基本膜特性の変調を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した人工知能（Artificial Intelligence; AI）による咀嚼障害鑑別モデルを用いて、ALSモデルマウスで咀嚼障害を検出することができた。同時に三叉神経系ニューロンの発火異常を神経生理学的手法により確認、ALS咀嚼障害の原因を解明し、今後脳内生理活性物質によるALS治療法の考案につながる可能性がある。さらに、ALS患者の咀嚼運動を観察し、咀嚼障害鑑別AIを発展させ、現在早期発見が困難なALS診断バイオマーカーの開発を行うことを目的としている。

研究成果の概要（英文）：In amyotrophic lateral sclerosis (ALS), we examined (1) how mastication disorder manifests itself, and (2) mastication behavior using artificial intelligence (AI). In addition, we investigated how the primary sensory neurons that control mastication are affected by the disease by electrophysiological studies. In (1), we used a video camera to capture the mastication behavior of ALS model mice and automatically detected the mastication cycle using AI, and found that the mastication cycle was significantly prolonged in ALS model mice from around 12 weeks of age compared to wild-type mice. In (2), we are currently conducting electrophysiological investigations of the primary sensory nerves that control mastication, and found abnormal firing activity and modulation of basic membrane properties in ALS model mice at maturity.

研究分野：ALS

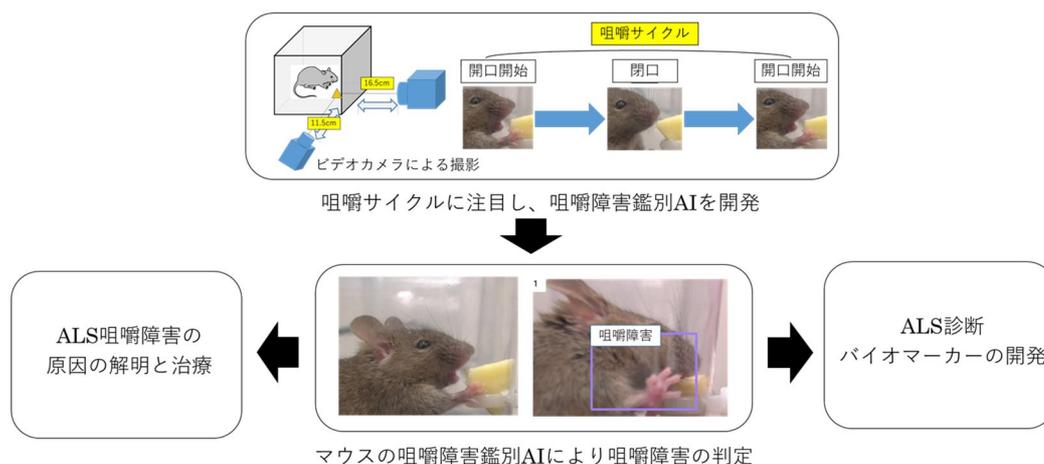
キーワード：ALS 筋萎縮性側索硬化症 三叉神経中脳路核 一次感覚神経 咀嚼障害 電気生理学

## 1. 研究開始当初の背景

筋委縮性側索硬化症 (ALS) は運動ニューロンの変性を伴った重篤な筋力低下を伴う難病であり、病気の進行に伴い咀嚼障害が生じ、栄養状態が悪化し死に至る。現在日本で承認されている ALS 治療薬はリルゾールとエダラボンのみで、ALS の根本的な治療薬が存在しないのが現状である。ALS 患者は病気の進行に伴い咀嚼障害が認められ、栄養状態が悪化し死期を早めることが報告されており (Lever et al., Dysphagia. 2009) 有効な治療薬がない ALS 患者に対する咀嚼障害の改善は、ALS 患者の生命予後に直接影響することが指摘されている (Simione et al., Dysphagia. 2016)。さらに、ALS 患者の早期発見につながるバイオマーカーが存在しないため、ALS 診断時には病期がすでに進行しており、適切な対症療法を行えず ALS 患者の死期を早めている。そのため臨床現場では ALS 患者を早期発見するバイオマーカーの開発が急務である。

当研究室はこれまで ALS モデルマウス (SOD1-G93A) を使った、神経生理学的な研究によって、咀嚼を制御する運動ニューロンの発火異常や (Venugopal et al., J Neurosci 2015)、一次感覚ニューロンの発火異常が乳幼児期より発現することを報告した (Seki et al., J Neurosci 2019)。さらに ALS モデルマウスの咀嚼運動の中で、開閉口運動のサイクル (咀嚼サイクル) に注目、咀嚼サイクルの延長を鑑別することで咀嚼障害を検出するマウスの咀嚼障害鑑別 AI を開発した。また進行期 ALS モデルマウスでは、咀嚼障害の進行と体重減少に強い相関関係があることがわかった (北岡, 関ら, 日本口腔外科学会 2020)。

そこで本研究では、申請者らが開発した人工知能 (Artificial Intelligence; AI) による咀嚼障害鑑別モデルを用いて、ALS モデルマウスで咀嚼障害を検出し、同時に三叉神経系ニューロンの発火異常を神経生理学的手法により確認、ALS 咀嚼障害の原因を解明し、脳内生理活性物質による治療法を考案する。さらに、ALS 患者の咀嚼運動を観察し、咀嚼障害鑑別 AI を発展させ、現在早期発見が困難な ALS 診断バイオマーカーの開発を行うことを目的とした。



## 2. 研究の目的

本研究の目的は (1) ALS 咀嚼障害の原因の解明、(2) ALS 咀嚼障害の治療法の考案、(3) ALS 診断バイオマーカーの開発である。

### (1) ALS 咀嚼障害の原因の解明

本研究では AI を使って ALS モデルマウスの咀嚼障害を検出するだけでなく、咀嚼障害を認めたマウスの三叉神経運動ニューロン、一次感覚ニューロンの発火異常を速やかに検出できること、また AI による行動観察とパッチクランプ法による神経生理学的なデータを癒合せせることで、咀嚼障害の直接の原因を探る手法が画期的である。この手法では、運動ニューロンの異常のみに注目するだけでなく、三叉神経運動ニューロン、一次感覚ニューロン、咀嚼筋を含めた三叉神経サーキットの異常に注目することが可能になる。

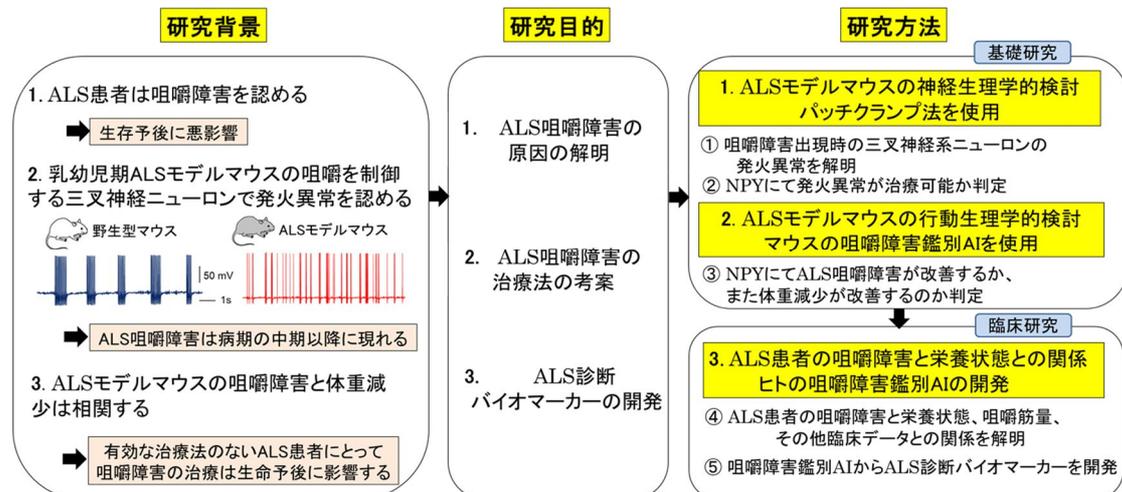
## (2) ALS 咀嚼障害の治療法の考案

申請者らは脳内生理活性物質であるニューロペプチド Y (NPY) が、乳幼児ラットの三叉神経一次感覚ニューロンの Na 電流を惹起し、発火を促進させることを報告した (Seki et al., J Neurosci Res 2020)。また本教室では、成熟ラットにおいて NPY を脳室内投与することにより咀嚼パターンが増加することを報告している (Ushimura et al., Behav Brain Res 2015)。以上のことから NPY は ALS モデルマウスの三叉神経一次感覚ニューロンの発火異常を是正するだけでなく、安全に脳室内投与が可能で、ALS 咀嚼障害の治療薬になる可能性がある。さらに摂食促進作用も含めて多角的な作用を有するため、体重減少に対する効果も期待され ALS 患者の QOL を改善させる ALS 治療薬となる可能性がある。

## (3) ALS 診断バイオマーカーの開発

本研究では ALS モデルマウスでの基礎研究結果をもとに、ALS 患者の臨床研究へ応用する。即ちマウスと同様に ALS 患者の咀嚼障害と体重や栄養状態に相関関係を認めれば、咀嚼障害の検出、治療が ALS 患者の早期発見、延命につながる可能性がある。マウスで開発した咀嚼障害鑑別 AI を発展させ、ヒトの咀嚼障害鑑別 AI を開発、ALS 患者の CT や MRI で撮影された画像を統合的に解析する Radiomics と組み合わせることで、現存しない有効で非侵襲的な ALS 診断バイオマーカーの開発まで発展させる点が先進的である。

さらに将来、通院困難な ALS 患者において、自宅で咀嚼運動を撮影、転送された動画より病気の進行や、治療薬の効果判定を遠隔で行う、オンライン診療の実現を目標とする。



## 3. 研究の方法

### (1) ALS 咀嚼障害の原因の解明

マウスの開閉口を Deep learning (DL) 技術による物体検出アルゴリズム、SSD (Single Shot Multibox Detector) にて自動検出、咀嚼サイクルを自動計算することで開発された ALS 咀嚼障害鑑別 AI を使用し、ALS モデルマウスの咀嚼障害を検出する。咀嚼障害が検出された ALS モデルマウスの脳幹を速やかに摘出、咀嚼を制御する三叉神経運動ニューロン、一次感覚ニューロンの発火活動をパッチクランプ法にて確認、同日齢の野生型マウスの発火活動と比較することで、ALS 咀嚼障害とニューロンの発火異常の関係を解明する。

### (2) ALS 咀嚼障害の治療薬の考案

咀嚼障害を起こす ALS 進行期のモデルマウスでも乳幼児期と同様の異常が認められれば、NPY が治療薬の候補となる。咀嚼障害出現時の ALS モデルマウスにおいて、三叉神経を含む脳幹スライスに NPY を灌流投与、パッチクランプ法のうち、c-clamp 法にて三叉神経一次感覚ニューロン、または運動ニューロンの発火異常が是正されているか確認する。効果が確認できれば、咀嚼障害出現時の ALS モデルマウスの第三脳室へ NPY を投与し、ALS 咀嚼障害が改善するのか AI にて判定、体重減少や死期が改善するのか確認する。

### (3)ALS 診断バイオマーカーの開発

ALS モデルマウスで開発した咀嚼障害鑑別 AI を ALS 患者の咀嚼障害へ応用、ヒトの咀嚼障害鑑別 AI を開発する。大阪大学医学部附属病院神経内科 長野清一准教授の協力のもと、ALS 患者の咀嚼運動を動画撮影、モデルマウスで使用した SSD にてヒトの咀嚼サイクルを検出し、同年齢、健常者の咀嚼サイクルと比較、ALS 患者の咀嚼障害を検出する。さらにヒトの咀嚼障害鑑別 AI にて咀嚼障害が検出された ALS 患者の咀嚼障害の進行が、体重減少、栄養状態、CT や MRI で撮影された画像を統合的に解析する Radiomics で得られた咀嚼筋の容量と相関関係があることを確認、ALS 診断バイオマーカーを開発する。

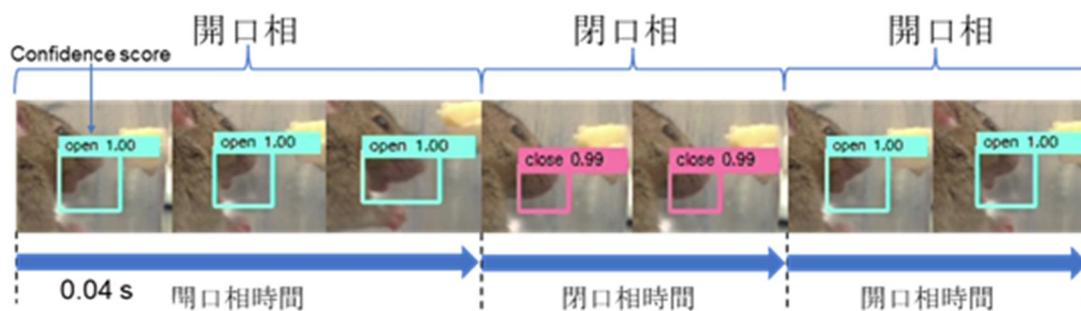
## 4. 研究成果

ALS モデルマウスと野生型マウスを用いて幼児期より摂食行動を観察、撮影した開閉口運動の動画情報から、SSD を使ってマウスの開閉口を検出する AI モデルを作成した。ALS モデルマウスにおいて開口と判定された開口相時間は 12 週齢より延長傾向を示し、15 週齢以降では野生型マウスと比較し有意な延長が認められた。ALS モデルマウスの体重は 12 週齢で減少に転じ、野生型マウスと比較し有意な減少が認められた。12 週齢以降の ALS モデルマウスでは、体重減少と開口相時間の延長に負の相関が認められたが、野生型マウスでは相関関係は認められなかった。

また、ALS モデルマウスと野生型マウスより脳幹スライス標本を作製し、単一の三叉神経一次感覚ニューロンから Patch clamp 法による Whole-cell 記録を行った。12 週齢の三叉神経一次感覚ニューロンにおける膜電位特性および活動電位特性について、両群間に有意な差は認められなかったが、連続発火活動を示す三叉神経一次感覚ニューロンの比率は mSOD1 群において減少傾向を示した。さらに連続発火活動を示す三叉神経一次感覚ニューロンにおいて、ALS モデルマウスでは野生型マウスと比較し、有意な発火活動持続時間の減少とスパイク周波数の上昇を認めた。

本研究では、ALS モデルマウスの咀嚼運動の変調と体重減少は同時期より認められ、三叉神経一次感覚ニューロンの発火活動パターンの変化を認めた。今後も本研究を継続し、ALS で観察される摂食障害の解明と治療薬の開発に役立てたいと考えている。ALS 咀嚼障害が ALS マウスの体重減少と関係があり、また三叉神経一次感覚ニューロンの異常とも関係していることを報告した。研究成果は Analysis of Feeding Behavior Characteristics in the Cu/Zn Superoxide Dismutase 1 (SOD1) SOD1G93A Mice Model for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Kitaoka Y, Seki S, Kawata S, Nishiura A, Kawamura K, Hiraoka S, Kogo M, Tanaka S. Nutrients 2023 にて報告を行った。

これらの成果をもとに ALS と感覚神経の関係について国際学会で意見交換を行った結果、一次感覚ニューロンを標的にした ALS 治療薬の開発の可能性があり、それを目指した研究についての詳説論文を報告した。研究成果は Characteristics of Sensory Neuron Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): Potential for ALS Therapy, Soju Seki, Yoshihiro Kitaoka, Sou Kawata, Akira Nishiura, Toshihiro Uchihashi, Shin-ichiro Hiraoka, Yusuke Yokota, Emiko Tanaka Isomura, Mikihiko Kogo, Susumu Tanaka. Biomedicines 2023 にて報告を行った。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Seki Soju, Kitaoka Yoshihiro, Kawata Sou, Nishiura Akira, Uchihashi Toshihiro, Hiraoka Shin-ichiro, Yokota Yusuke, Isomura Emiko Tanaka, Kogo Mikihiro, Tanaka Susumu	4. 巻 11
2. 論文標題 Characteristics of Sensory Neuron Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): Potential for ALS Therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 2967 ~ 2967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines11112967	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Usta Sena Zeynep, Uchihashi Toshihiro, Kodama Shingo, Kurioka Kyoko, Inubushi Toshihiro, Shimooka Takuya, Sugauchi Akinari, Seki Soju, Tanaka Susumu	4. 巻 24
2. 論文標題 Current Status and Molecular Mechanisms of Resistance to Immunotherapy in Oral Malignant Melanoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 17282 ~ 17282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242417282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kitaoka Yoshihiro, Seki Soju, Kawata Sou, Nishiura Akira, Kawamura Kohei, Hiraoka Shin-ichiro, Kogo Mikihiro, Tanaka Susumu	4. 巻 15
2. 論文標題 Analysis of Feeding Behavior Characteristics in the Cu/Zn Superoxide Dismutase 1 (SOD1) SOD1G93A Mice Model for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1651 ~ 1651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu15071651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Saori Yamada , Susumu Tanaka , Soju Seki , Mikihiro Kogo	4. 巻 63
2. 論文標題 Membrane excitabilities in neonatal rat mesencephalic trigeminal neurons under dietary zinc deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 242-246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnugd.20-0566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Susumu, Seki Soju, Ono Yudai, Enomoto Akifumi, Kogo Mikihiko	4. 巻 753
2. 論文標題 Persistent sodium conductance contributes to orexin-A-mediated modulation of membrane excitability in neonatal rat mesencephalic V neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135846 ~ 135846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2021.135846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yoshihiro Kitaoka, Soju Seki, Sou Kawata, Akira Nishiura, Kohei Kawamura, Shin-ichiro Hiraoka, Susumu Tanaka, Mikihiko Kogo
2. 発表標題 Analysis of feeding behavior characteristics of ALS mice model
3. 学会等名 International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery (ICOMS) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北岡好大, 関壮樹, 川田創, 西浦輝, 川村晃平, 平岡慎一郎, 田中晋
2. 発表標題 Analysis of feeding behavior characteristics of ALS model mice
3. 学会等名 第26回 口腔顔面神経機能学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshihiro Kitaoka, Soju Seki, Sou Kawata, Akira Nishiura, Kohei Kawamura, Shin-ichiro Hiraoka, Mikihiko Kogo, Susumu Tanaka
2. 発表標題 Analysis of feeding behavior characteristics of ALS model mice
3. 学会等名 Oral Neuroscience 2022 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北岡 好大, 関 壮樹, 川田 創, 西浦 輝, 平岡 慎一郎, 田中 晋
2. 発表標題 AIを用いたALSモデルマウスの咀嚼運動解析と体重減少との関係
3. 学会等名 第67回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関 壮樹, 田中 晋, 山田早織, 石井庄一郎, 古郷幹彦
2. 発表標題 摂食関連神経ペプチドによる三叉神経中脳路核ニューロン周波数応答特性の神経修飾作用
3. 学会等名 第25回 口腔顔面神経機能学会総会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Soju Seki
2. 発表標題 Early impairment of Mes V neuron comparing other types of sensory neurons in ALS model mouse
3. 学会等名 Oral Neuroscience 2021 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川田 創, 関 壮樹, 北岡 好大, 西浦 輝, 古郷 幹彦, 田中 晋
2. 発表標題 ALSモデルマウスにおける咀嚼機能と四肢運動機能の比較および筋体積減少の特徴
3. 学会等名 第68 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 関 壮樹	4. 発行年 2023年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 2
3. 書名 月刊「細胞」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------